

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

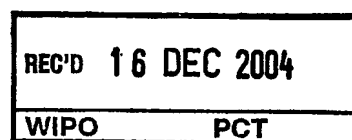
28.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年10月30日

出願番号  
Application Number: 特願2003-370507  
[ST. 10/C]: [JP 2003-370507]



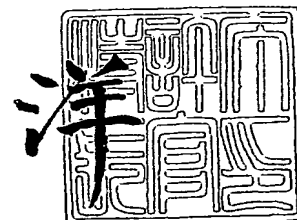
出願人  
Applicant(s): 大正製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3109892

【書類名】 特許願  
【整理番号】 A31646A  
【提出日】 平成15年10月30日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都豊島区高田 3-24-1 大正製薬株式会社内  
    【氏名】 吉本 真  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都豊島区高田 3-24-1 大正製薬株式会社内  
    【氏名】 若松 正樹  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都豊島区高田 3-24-1 大正製薬株式会社内  
    【氏名】 石井 愛子  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000002819  
    【氏名又は名称】 大正製薬株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 110000109  
    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
    【代表者】 今村 正純  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 170347  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されており、脳の神経細胞で該遺伝子を発現し、かつ脳の黒質におけるドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して有意に減少していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 2】**

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子がヒト  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子又はその変異体である、請求項 1 に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 3】**

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が、野生型ヒト  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列において 53 番目のアミノ酸残基である Ala 残基が Thr 残基に置換している変異体である、請求項 1 又は 2 に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 4】**

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が、野生型  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列の C 末端を欠損させた遺伝子である、請求項 1 から 3 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 5】**

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をドーパミン産生神経細胞で発現させることができるプロモーターの制御下に組み込んだ組み換え DNA が導入されている、請求項 1 から 4 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 6】**

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をドーパミン産生神経細胞で発現させることができるプロモーターが、チロシンヒドロキシラーゼのプロモーターである、請求項 1 から 5 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 7】**

若年齢で脳内ドーパミン量が野生型動物と比較して有意に減少している、請求項 1 から 6 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 8】**

若年齢で脳内ドーパミン量が野生型動物と比較して 85% 以下まで減少している、請求項 1 から 7 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 9】**

チロシンヒドロキシラーゼの発現量が野生型動物と比較して 80% 以下まで減少している、請求項 1 から 8 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 10】**

自発運動量が野生型動物と比較して 60% 以下まで減少している、請求項 1 から 9 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 11】**

非ヒト哺乳動物がマウスである、請求項 1 から 10 の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

**【請求項 12】**

請求項 1 から 11 の何れかに記載の非ヒト哺乳動物またはその一部を用いることを特徴とする、ドーパミン様作用を有する物質のスクリーニング方法。

**【請求項 13】**

ドーパミン様作用を有する物質がパーキンソン病の治療剤又は予防剤である、請求項 12 に記載のスクリーニング方法。

**【請求項 14】**

請求項 12 又は 13 に記載のスクリーニング方法により得られる物質。

**【請求項 15】**

請求項 12 又は 13 に記載のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分として含有する、パーキンソン病の治療剤又は予防剤。

## 【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスジェニック非ヒト哺乳動物

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されているトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。より詳細には、本発明は、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を脳で発現し、かつ脳の黒質におけるドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して有意に減少していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物、並びにその利用に関する。

## 【背景技術】

【0002】

パーキンソン病は成人・高齢者にみられる神経変性疾患の一つである。パーキンソン病では一般に運動機能の障害が見られ、病変としては、中脳黒質のドーパミン産生神経細胞の変性・消失が認められる。この病変による中脳-基底核系における選択的なドーパミン量の低下は、ドーパミン前駆体である L-ドーパを経口投与することにより抑制することができ、これにより症状の改善がみられる。従って、パーキンソン病の治療薬としては、L-ドーパおよびドーパミン受容体アゴニストが使用されている。しかしながら、ドーパミン前駆体の投与は対症療法に過ぎず、症状は次第に進行し、これらの薬効も衰弱するため、患者はやがて死に到ることが多い。

【0003】

また、パーキンソン病の病理学的所見の一つとして、レビー小体の出現がある。レビー小体は、黒質、青斑核、迷走神経核などにおける残存ニューロンにおいて、細胞内に出現する特異的封入体である。さらに、脳幹病変に加え、大脳皮質にもレビー小体が出現する疾患として、レビー小体を伴う痴呆症 (DLB) が知られている。

【0004】

パーキンソン病の多くは、孤発例であるが、稀に常染色体優性遺伝をとる家系が存在する。家族性パーキンソン病家系の連鎖解析から、パーキンソン病の原因遺伝子として染色体第4番長腕上の  $\alpha$ -シヌクレイン 遺伝子が同定され、ミスセンス変異 (A53T、又はA30P) が確認されている (Polymeropoulos MH, 他、Science 1997 Jun 27;276(5321):2045-7; 及び、Kruger R, 他、Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet. 1998 Feb;18(2):106-8)。その後、抗  $\alpha$ -シヌクレイン抗体を用いた生化学的検討や免疫組織学的検討によって孤発例のパーキンソン病やDLBのレビー小体は、 $\alpha$ -シヌクレイン タンパク質が蓄積してできることが明らかになり、パーキンソン病の原因としての  $\alpha$ -シヌクレイン タンパク質蓄積の重要性が明らかとなってきた。

【0005】

これまでに、パーキンソン病のモデルマウスとして、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質の野生型又は変異型を過剰発現するトランスジェニック動物が報告されているが (国際公報 WO 01/60794 号公報、国際公報 WO 98/59050 号公報など)、生後直ぐに脳内ドーパミン量が有意に減少しているトランスジェニック動物については未だ報告されていない。また、中脳・黒質のドーパミン産生神経細胞の変性・消失が認められる、特にパーキンソン病の病理学的特徴である黒質緻密部のドーパミン産生神経細胞に変性・消失が認められるが、腹側被蓋野部分には変化が認められないトランスジェニック動物についての報告はない。

【0006】

【非特許文献1】 Polymeropoulos MH, 他、Science 1997 Jun 27;276(5321):2045-7

【非特許文献2】 Kruger R, 他、Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet. 1998 Feb;18(2):106-8

【特許文献1】 国際公報 WO 01/60794 号公報

【特許文献2】 国際公報 WO 98/59050 号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明は、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されたパーキンソン病モデル動物を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、上記モデル動物を用いてドーパミン様作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供することを解決すべき課題とした。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、導入遺伝子として、野生型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列において53番目のアミノ酸残基であるAla残基がThr残基に置換され、かつ該アミノ酸配列のC末端を欠損させた変異体遺伝子を使用してトランスジェニックマウスを作製した。さらに本発明者らは、作製したトランスジェニックマウスにおける脳内ドーパミン量、チロシンヒドロキシラーゼ発現量、及び自発運動量などを解析した結果、パーキンソン病のモデル動物として有用性の高いマウスであることを確認した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

## 【0009】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1)  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されており、脳の神経細胞で該遺伝子を発現し、かつ脳の黒質におけるドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して有意に減少していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

## 【0010】

(2)  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子がヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子又はその変異体である、

(1)に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(3)  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が、野生型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列において53番目のアミノ酸残基であるAla残基がThr残基に置換している変異体である、

(1)又は(2)に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(4)  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が、野生型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列のC末端を欠損させた遺伝子である、(1)から(3)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

## 【0011】

(5)  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をドーパミン産生神経細胞で発現させることができるプロモーターの制御下に組み込んだ組み換えDNAが導入されている、(1)から(4)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(6)  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をドーパミン産生神経細胞で発現させることができるプロモーターが、チロシンヒドロキシラーゼのプロモーターである、(1)から(5)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

## 【0012】

(7) 若年齢で脳内ドーパミン量が野生型動物と比較して有意に減少している、(1)から(6)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(8) 若年齢で脳内ドーパミン量が野生型動物と比較して85%以下まで減少している、(1)から(7)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(9) チロシンヒドロキシラーゼの発現量が野生型動物と比較して80%以下まで減少している、(1)から(8)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(10) 自発運動量が野生型動物と比較して60%以下まで減少している、(1)から(9)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

(11) 非ヒト哺乳動物がマウスである、(1)から(10)の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

## 【0013】

(12) (1)から(11)の何れかに記載の非ヒト哺乳動物またはその一部を用いる

ことを特徴とする、ドーパミン様作用を有する物質のスクリーニング方法。

(13) ドーパミン様作用を有する物質がパーキンソン病の治療剤又は予防剤である、  
(12) に記載のスクリーニング方法。

(14) (12) 又は (13) に記載のスクリーニング方法により得られる物質。

(15) (12) 又は (13) に記載のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分として含有する、パーキンソン病の治療剤又は予防剤。

【発明の効果】

【0014】

本発明により提供される、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を脳の神経細胞で過剰発現し、かつ脳の黒質におけるドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して有意に減少していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、パーキンソン病モデル動物として、パーキンソン病の発症機構の解明、パーキンソン病の予防剤や治療剤のスクリーニングのために有用である。特に本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、生後8週齢で脳内ドーパミン量が有意に減少しているため、長期間飼育する必要がないという利点を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の特徴

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されており、脳の神経細胞で該遺伝子を発現し、かつ脳の黒質におけるドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して有意に減少していることを特徴とする。特に好ましい態様によれば、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、以下の特徴の何れか1つ以上を有している。

【0016】

(1) 若年齢で脳内ドーパミン量が野生型動物と比較して有意に減少している。好ましくは生後8週齢で脳内ドーパミン量が野生型動物と比較して85%以下、より好ましくは70%以下、さらに好ましくは60%以下まで減少している。

(2) 黒質緻密部のドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して減少しているが、腹側被蓋野のドーパミン産生神経細胞数には変化がない。

(3) チロシンヒドロキシラーゼの発現量が野生型動物と比較して80%以下、好ましくは70%以下、より好ましくは60%以下まで減少している。

(4) 自発運動量が野生型動物と比較して60%以下、好ましくは50%以下まで減少している。

【0017】

本明細書において「若年齢」とは、生後5日から1年齢程度の年齢を意味する。

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物において、脳内ドーパミン量は、例えば、脳組織からドーパミン含有試料を調製し、HPLCなどにより分析することにより測定することができる。また、黒質のドーパミン産生神経細胞数は、チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞数を測定することにより測定することができる。また、チロシンヒドロキシラーゼの発現量は、ノーザンブロット、RT-PCR又は免疫組織染色などにより測定することができる。さらに、運動機能及び自発運動量については、本願明細書の実施例10及び11に記載又はこれに準じた方法により測定することができる。

【0018】

本明細書で言う「 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子」は公知の遺伝子である。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子としては、ヒトなどの哺乳動物の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子、並びに、これらの遺伝子と同じ機能を有する変異体遺伝子の何れかを使用することができる。ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列を配列表の配列番号16に記載する。

【0019】

本発明では、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の変異体遺伝子を使用することもできる。変異体

遺伝子とは、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のDNA配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたものを意味し、具体的には、該遺伝子中の塩基配列の一部が欠損した遺伝子、該遺伝子の塩基配列の一部が他の塩基配列で置換された遺伝子、該遺伝子の一部に他の塩基配列が挿入された遺伝子などを用いることができる。欠損、置換または付加される塩基の数は、特に限定されないが、一般的には1から50個程度、好ましくは1から15個程度、より好ましくは1から6個程度である。このような塩基配列の欠損、置換または付加によって、 $\alpha$ -シヌクレインのアミノ酸配列において、好ましくは1ないし5個程度、より好ましくは1または2個程度のアミノ酸の欠損、置換または付加が生ずることになる。なお、これらの変異体遺伝子としては、野生型の $\alpha$ -シヌクレインと同等の機能を有するポリペプチドをコードしているものを使用することが好ましい。本明細書で言う「 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子」とは、野生型の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のみならず、上記したような変異体遺伝子の全てを包含する最も広い意味を有する。

#### 【0020】

本発明で用いる $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子としては、野生型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のアミノ酸配列（配列表の配列番号16）におけるアミノ酸番号30のアラニン残基が他のアミノ酸に置換した変異、及び／又は、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換し変異を有する、変異型の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子であることが好ましい。このような変異型の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のDNAは、例えば、公知のヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をコードするDNAを鋳型とし、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質のアミノ酸番号30、及び／又はアミノ酸番号53のアラニン残基をコードする $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の塩基を他のアミノ酸をコードするように置換したミスセンス変異導入プライマーを用いたPCRによって取得することができる。

#### 【0021】

本発明においては、配列番号16に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がプロリン残基に置換する変異、並びに配列番号16に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がスレオニン残基に置換する変異が好ましく、この中でも後者の変異が特に好ましい。さらに本発明では、上記アミノ酸配列のC末端（C末端の1～20アミノ酸残基、好ましくはC末端の5～15アミノ酸残基、例えば、C末端の10アミノ酸残基など）を欠損させた遺伝子を使用することが好ましい。53番目のアミノ酸残基であるアラニン残基がスレオニン残基に置換している変異体を使用することによりパーキンソン病の病態を再現することが可能になり、また、C末端を欠損させた遺伝子を使用することにより該遺伝子の発現量を向上させることが可能になる。

#### 【0022】

なお、PCR、プライマーの作製、ゲノムDNAの調製、クローニング、酵素処理等の方法は、当業者に周知の常法により行うことができる。

#### 【0023】

### (2) 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法は特に限定されないが、例えば、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をプロモーターの制御下に組み込んだ発現ベクターを受精卵などに導入することにより作製することができる。以下、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の導入により該遺伝子を、特に脳の神経細胞で発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法について説明する。

#### 【0024】

トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製のために用いる導入遺伝子としては、上記した $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を適当な哺乳動物用プロモーターの下流に連結した組換え遺伝子を使用することが好ましい。当該 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の下流には、所望により、ポリAシグナルを連結することができる。

#### 【0025】

導入遺伝子の構築に用いる哺乳動物用プロモーターの種類は特に制限されないが、 $\alpha$ -

シヌクレイン遺伝子を神経細胞（特に好ましくは、ドーパミン産生神経細胞）において発現させることができるプロモーターを用いることが好ましい。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のドーパミン産生神経細胞での発現を駆動できるプロモーターの具体例としては、チロシンヒドロキシラーゼのプロモーターなどが挙げられる。その他、例えば、ウイルス（例、サイトメガロウイルス、モロニー白血病毒、JCウイルス、乳癌ウイルスなど）由来遺伝子プロモーター、各種哺乳動物（例、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（例、ニワトリなど）由来のプロモーターなどを適宜使用することもできる。

#### 【0026】

さらに、本発明で用いる組換え遺伝子には、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の発現に必要なターミネーターを連結してもよい。該ターミネーターは、トランスジェニック動物において、目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（いわゆるポリA）として使用され、ウイルス由来、各種哺乳動物または鳥類由来の各遺伝子の配列が用いることができる。具体的には、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。その他、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をさらに高発現させる目的で、既知の遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域を連結することができる。さらには、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の5'上流に、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも可能である。

#### 【0027】

上記導入遺伝子に組み込まれた $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子は、受精卵等の細胞内で発現すると、細胞内に $\alpha$ -シヌクレインが産生されるようになる。

#### 【0028】

$\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の導入により $\alpha$ -シヌクレインを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物の受精卵に $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を導入し、当該受精卵を偽妊娠雌性非ヒト哺乳動物に移植し、当該非ヒト哺乳動物から $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入された非ヒト哺乳動物を分娩させることにより作製することができる。

#### 【0029】

非ヒト哺乳動物としては、例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ラット、ウサギ等のげっ歯類の他、ニワトリ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ブタ、サル等を使用することができるが、作製、育成及び使用の簡便さなどの観点から見て、マウス、ハムスター、モルモット、ラット、ウサギ等のげっ歯類が好ましく、そのなかでもマウスが最も好ましい。

#### 【0030】

本発明で用いるトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、胚芽細胞と、生殖細胞あるいは体細胞とが、非ヒト哺乳動物またはこの動物の先祖に胚発生の段階（好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）において外来性の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含む組み換え遺伝子を導入することによって作出される。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含む組み換え遺伝子の構築は上記した通りである。

#### 【0031】

受精卵細胞段階における $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように維持されるように行う。遺伝子導入後の作出動物の胚芽細胞において、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が存在することは、作出動物の後代がすべてその胚芽細胞および体細胞のすべてに $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が存在することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を有する。

#### 【0032】

本発明のトランスジェニック動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、当該遺伝子保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配すること



によりすべての子孫が該遺伝子を過剰に有するように繁殖継代することができる。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の発現部位を同定するためには $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の発現を個体、臓器、組織、細胞の各レベルで観察することができる。また、 $\alpha$ -シヌクレインの抗体を用いた酵素免疫検定法によりその発現の程度を測定することも可能である。

#### 【0033】

以下、トランスジェニック非ヒト哺乳動物がトランスジェニックマウスの場合を例に挙げて具体的に説明する。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をコードするcDNAをプロモーターの下流に含有する導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、偽妊娠雌性マウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりトランスジェニックマウスを作製することができる。上記マウスの受精卵としては、例えば、129/sv、C57BL/6、BALB/c、C3H、SJL/Wt等に由来するマウスの交配により得られるものなら任意のものを使用できる。

#### 【0034】

また、注入する導入遺伝子の数は受精卵1個当たり100～3000分子が適当である。そしてまた、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等よりDNAを抽出し、導入した $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

#### 【0035】

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、 $\alpha$ -シヌクレインを過剰発現することの特徴とするものであり、パーキンソン病の治療薬又は予防薬のスクリーニング試験に利用可能なモデルであり、またパーキンソン病の発生機構の解明などの研究分野においても有用である。

#### 【0036】

また、上記した本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の一部としては、非ヒト哺乳動物の細胞、細胞内小器官、組織および臓器のほか、頭部、指、手、足、腹部、尾などが挙げられ、これらも全て本発明の範囲内に属する。

#### 【0037】

(3) ドーパミン様作用を有する物質(例えば、パーキンソン病の治療剤及び/又は予防剤など)のスクリーニング

本発明によるドーパミン様作用を有する物質のスクリーニング方法は、 $\alpha$ -シヌクレインを過剰発現する本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いて行うことができる。即ち、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物(例えば、トランスジェニックマウスなど)に、被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト哺乳動物の生理学的データや運動能力などを評価・検討することにより、該被検物質のパーキンソン病に対する治療効果や予防効果を評価することができる。

#### 【0038】

あるいはまた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、投与後における $\alpha$ -シヌクレインの発現状態や生体内における動態を分析することにより、該被検物質のパーキンソン病に対する治療効果や予防効果を評価することもできる。

#### 【0039】

すなわち、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を利用することにより、パーキンソン病の治療効果及び予防効果を評価することが可能であり、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、パーキンソン病の病態評価モデル動物として利用することができる。例えば、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いて、これらの病態回復および重篤程度を判定し、この疾患の治療方法の検討を行うことも可能である。

#### 【0040】

さらにまた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いることによって、 $\alpha$ -シヌクレインの過剰発現と、上記疾病の進行度などを分析することにより、該疾患の発症・進行のメカニズムを解明することができる。

## 【0041】

本発明のスクリーニング方法に供される被験物質としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。またペプチドライブラリーや化合物ライブラリーなど、多数の分子を含むライブラリーを被験物質として使用することもできる。

## 【0042】

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被験物質を投与する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられる。また、被験物質の投与量は、投与方法、被験物質の性質などにあわせて適宜選択することができる。

## 【0043】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質は、上記した被験物質から選ばれた物質であり、パーキンソン病に対して予防・治療効果を有するので、パーキンソン病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた物質から誘導される化合物も同様に医薬として用いることができる。該スクリーニング方法で得られた物質は塩を形成していてもよく、該物質の塩としては、生理学的に許容される酸（例えば、無機酸、有機酸）または塩基（例えば、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。

## 【0044】

塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

## 【0045】

該スクリーニング方法で得られた物質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。

## 【0046】

例えば、該物質を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などと一緒に混和することによって製剤を製造することができる。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなビヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを、溶解または懸濁させるなど常法に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などを併用することもできる。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。

## 【0047】

また、上記のパーキンソン病の治療剤及び／又は予防剤には、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などを

配合してもよい。

#### 【0048】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物に対して投与することができる。該物質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、経口投与する場合、一般的に成人においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~100mg程度、好ましくは約0.1~50mg程度を静脈注射により投与する。

#### 【0049】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

#### 【実施例】

#### 【0050】

実施例1：ヒト型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子のクローニング

ヒト脳由来cDNA（クロンテック社製）を鋳型とし、配列-1のオリゴヌクレオチドと配列-2のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、PCRによりヒト型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を増幅した。当該反応にはタカラバイオ社製のキット（TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2）を用い、タカラバイオ社製のPCRサーマルサイクラーMPを使用した。

#### 【0051】

反応組成液

ヒト脳由来cDNA	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR緩衝液	5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	4 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド（配列-1）	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド（配列-2）	2 $\mu$ l
水	35.5 $\mu$ l
LA Taqポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

#### 【0052】

反応条件

94℃で2分保持後、94℃で30秒間反応させ、60℃まで冷却し、60℃で1分保持し、更に72℃で3分間保持した。これを30回繰り返して、目的配列を増幅させた。

#### 【0053】

配列-1：GGAATTCAATTAGCCATGGATGTATTTC（配列番号1）

配列-2：AGCCACTTAAGGAACCAAGTGCATACC（配列番号2）

#### 【0054】

増幅したDNA断片をアガロースゲル電気泳動（ゲル濃度1%）で分画し、常法に従ってヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含むバンド（1.24kb）を切り出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出と精製はGENECLEANII Kit（バイオ101社製）を用いて行った。この精製DNA断片を以下の方法により塩基配列決定用ベクター、pT7Blue T-Vector（ノバジェン社製）に組み込んだ。ライゲーション溶液は、タカラバイオ社製のキット（TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2）を用い、16℃で1.5時間反応させた。

#### 【0055】

反応組成液

PCR産物	1 $\mu$ l (50 ng)
T7 Blue T-vector	1 $\mu$ l (17 ng)
水	3 $\mu$ l

ライゲーション溶液

5  $\mu$  l

総量

10  $\mu$  l

## 【0056】

上記反応溶液を用いて常法に従って大腸菌K12株DH5の形質転換を行った。形質転換体をアンピシリン (Amp) 50  $\mu$  g/mlを含有するLB寒天培地にプレーティングし、37℃で一晩培養した。コロニーを50  $\mu$  g/mlのAmpを含むLB液体培地10 mlに接種して37℃で一晩培養し、遠心分離によって菌体を集めた後、QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (キアゲン社製) で組換えDNAを精製し、常法に従って全塩基配列を決定した。塩基配列はGenbankに登録されている配列 (accession番号: L08850) と同一であった。このようにして構築した組み換えDNAをpT7NACP140と命名した。

## 【0057】

実施例2: 変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の調製

pT7NACP140を鋳型とし、TaKaRa LA PCR in vitro Mutagenesis Kit (タカラバイオ社製) を用いて53残基目のアラニン (コドン: GCA) がスレオニン (コドン: ACA) に変わるように点突然変異を導入した。

反応組成液

pT7NACP140	1 $\mu$ l (1 ng)
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-3または5)	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-4または6)	2 $\mu$ l
10 $\times$ PCR緩衝液	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	4 $\mu$ l
水	35.5 $\mu$ l
LA Taqポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

## 【0058】

反応条件

94℃で2分保持後、94℃で30秒間反応させ、60℃まで冷却し、60℃で2分保持し、更に72℃で3分間保持した。これを25回繰り返して、目的配列を増幅させた。

配列-3: AGCTCTAATACGACTCACTATAGGG (配列番号3)

配列-4: CAGCCACTGTGTGCCACACCATGTC (配列番号4)

配列-5: AGGGTTTTTCCCAGTCACGACGTTG (配列番号5)

配列-6: GCATGGTGTGGCAACAGTGGCTG (配列番号6)

## 【0059】

配列-3と配列-4を用いて得られたPCR産物と、配列-5と配列-6を用いて得られたPCR産物を等量混合し、94℃で10分間加熱後、60分間かけて37℃まで冷却し、37℃で15分間保持した。この反応溶液を鋳型としてPCR反応を実施し、目的とする点突然変異が導入されたDNAを増幅した。

反応組成液

混合液	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-3)	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-5)	2 $\mu$ l
10 $\times$ PCR緩衝液	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	4 $\mu$ l
水	35.5 $\mu$ l
LA Taqポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

## 【0060】

反応条件

94℃で2分保持後、94℃で30秒間反応させ、60℃まで冷却し、60℃で2分保持し、更に72℃で3分間保持した。これを25回繰り返して、目的配列を増幅させた。

#### 【0061】

実施例1に記載したのと同様の方法を用いて増幅したDNA断片を精製し、pT7Blue T-Vector (ノバジェン社製) に組み込んだ。このようにして構築した組み換えDNAをpT7NACP140mと命名した。常法に従ってヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含む領域の全塩基配列を決定し、当該遺伝子内に所望の点突然変異が導入されたことを確認した。

#### 【0062】

pT7NACP140mを鋳型とし配列-1のオリゴヌクレオチドと配列-7のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、ヒト $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の開始コドンから130残基目のコドンまでを含む領域をPCRにより増幅した。配列-7のオリゴヌクレオチドは130残基目のコドンの直後に終止コドンが来るように設計した。また当該PCR反応にはPfu DNAポリメラーゼ (ストラタジーン社製) を用い、DNA増幅中に新たな突然変異が入らないようにした。

#### 【0063】

##### 反応組成液

pT7NACP140m	1 $\mu$ l (10 ng)
10×PCR緩衝液	5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	4 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-1)	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-7)	2 $\mu$ l
水	35.5 $\mu$ l
Pfu DNAポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

#### 【0064】

##### 反応条件

94℃で2分保持後、94℃で30秒間反応させ、60℃まで冷却し、60℃で1分保持し、更に72℃で3分間保持した。これを30回繰り返して、目的配列を増幅させた。

配列-7: TAGCCTTAAGTTACTCAGAAGGCATTT (配列番号7)

得られたDNA断片を実施例1に記載したのと同様の方法を用いてpCRBlunt (インビトロジェン社製) に組み込んだ。このようにして構築した組み換えDNAをpCRNACP130mと命名した。常法に従って変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含む領域の全塩基配列を決定し、所望の配列を有することを確認した。

#### 【0065】

##### 実施例3: マイクロインジェクション用DNA断片の調製

pCRNACP130mをPstIとSpeIで切断してアガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度1%) で分画し常法に従って変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含むバンド (417bp) を切り出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出と精製は、GENECLEANII Kit (バイオ101社製) を用いて行った。さらにDNA断片の両端を常法に従って平滑化した。次にラット・チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子のプロモーターを有する発現ベクター、pTH-9kb (Iwawaki, T. et al. Biochem Biophys Res Commun 274, 590-595 (2000)) をXhoIとHindIIIで切断し、プロモーターを有する断片をpBST-N (Kobayashi, K. et al. Proc Natl Acad Sci USA 89, 1631-1635 (1992)) に挿入してpRTH-BstNを調製した。pRTH-BstNをEcoRIで切断し、両端を常法に従って平滑化後、脱リン酸化した。当該ベクターと上述した変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を含む断片を混合して実施例1に記載したのと同様の方法で結合して大腸菌K12株DH5の形質転換を行い、形質転換体から組み換えDNAを調製した。このようにして構築した組み換え

DNAをpRTHNACP130mと命名した。pRTHNACP130mをSalIで切断した後アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)で分画し、常法に従って目的とするバンド(11.4kb)を切り出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出と精製は、GENECLEANII Kit(バイオ101社製)を用いて行った。精製したDNA断片をダルベッコ・リン酸緩衝溶液(インビトロジェン社製)に融解し(終濃度12.6ng/ $\mu$ l(=2000コピー/2pl))、これをマイクロインジェクション用DNA溶液とした。

## 【0066】

実施例4:変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン・トランスジェニックマウスの作製

日本チャールスリバーが推奨する方法を用いて、B6C3F1系統の凍結前核期卵(日本チャールスリバーより購入)を融解した。すなわち凍結前核期卵が入ったクライオチューブ(直径12mm、長さ40mm、ナルジェヌンク社製)を液体窒素から取り出し、室温(23℃)にて1分間放置した。37℃に加温したマウス胚0.25Mシュウクロース液(ダイアヤトロン社製)900 $\mu$ lを添加し、ピペティングにより素早く凍結塊を融解した。融解液を直径35mmのプラスチックシャーレに移し、胚操作用キャピラリーを用いて前核期卵を回収した。前核期卵をPB1緩衝液で3回洗浄した後、マウス胚mW培地(三菱化学ヤトロン社製)で1時間培養(37℃、5%CO<sub>2</sub>)した。

## 【0067】

PB1緩衝液

組成 g/100ml 滅菌蒸留水

NaCl	0.8
KCl	0.02
CaCl <sub>2</sub>	0.012
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.02
MgCl $\cdot$ 6H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.115
ピルビン酸ナトリウム	0.0036
グルコース	0.1
ペニシリンGカリウム明治(明治製菓社製)	0.0075
アルブミンフラクションVパウダー(シグマ社製)	0.3

## 【0068】

マイクロインジェクション装置(ノマルスキー微分干渉装置付き倒立顕微鏡TE300(ニコン社製)にマイクロマニピュレーターMMO-204(ナリシゲ社製)、マイクロインジェクターIM-50A/B(ナリシゲ社製)、マイクロシリンジ(ハミルトン社製)を取り付けたもの)を用いて、常法に従って前核期卵の雄性前核へ実施例3で調製したDNA溶液を2pl(2000コピー)注入した。受精卵保持用マイクロキャピラリーとDNA注入用マイクロキャピラリーは、長さ10cm、直径1.0mm、内径0.75mmのホウ珪酸塩ガラス管(サッター社製)を、プラーP-97/IVF(サッター社製)及びマイクロフォーシMF-900(ナリシゲ社製)で加工して作製した。DNA注入操作用スライドガラスは、マイクロカバーガラス(マツナミガラス社製)にスウインネクスガasket015(ミリポア社製)を張り付けたものを使用した。

## 【0069】

DNA注入後の前核期卵をマウス胚mW培地(三菱化学ヤトロン社製)で一晩培養(37℃、5%CO<sub>2</sub>)した。翌朝2細胞期に発生した胚を常法に従ってレシピエントマウス(ICR系統、雌、8週齢(日本SLCより購入))を同系統の精管結紮雄マウス(10週齢、日本SLCより購入)と交配させ偽妊娠させたもの)の卵管膨大部へ移植した。移植19日後にレシピエントマウスの帝王切開を行い、移植胚に由来する仔マウスを摘出した。仔マウスは離乳するまでフォスターマザー(出産1日後のICR系統雌マウス(12週齢、日本SLCより購入))に保育させ、帝王切開の28日後に仔マウスを離乳させファウンダーマウスとした。

## 【0070】

実施例5:変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン・トランスジェニックマウスの選別

離乳した仔マウスからジエチルエーテル麻酔下で尾の先端約5mmを切断後、耳パンチ法により個体識別した。DNA抽出緩衝液(100mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH7.5)、20mM EDTA、1% SDS) 400 $\mu$ lに対しプロテナーゼK(20mg/ml:タカラバイオ社製)を20 $\mu$ l添加した溶液中において、採取した尾を55℃で一晩浸漬振盪した。この融解液1 $\mu$ lを滅菌蒸留水で100倍希釈し試料DNAとした。導入したDNAの一部の配列を有する配列-8と配列-9、及び内部標準としてアセチルコリン受容体蛋白であるRapsynの一部の配列を有する配列-10と配列-11のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを実施した。当該反応にはTaKaRa LA Taq<sup>TM</sup>(タカラバイオ社製)を用い、アプライドバイオシステムズジャパン社製のGene Amp PCR System 9700を使用した。

## 【0071】

配列-8:GTGGCTGCTGCTGAGAAAAC(配列番号8)

配列-9:GTGGGGCTCCTTCTTTCATTC(配列番号9)

配列-10:AGGACTGGGTGGCTTCCAACTCCCAGACAC(配列番号10)

配列-11:AGCTTCTTCATTGCTGCGCGCCAGGTTCAGG(配列番号11)

## 【0072】

反応組成液

試料DNA	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド(配列-8)	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド(配列-9)	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド(配列-10)	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド(配列-11)	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR緩衝液	2.5 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	2 $\mu$ l
水	13.75 $\mu$ l
LA Taqポリメラーゼ	0.25 $\mu$ l
総量	25 $\mu$ l

## 【0073】

PCRの反応条件として、94℃で9分保持後、94℃で1分間、60℃で1分間、更に72℃で2分間反応させた。これを5回繰り返した後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間の反応を28回繰り返し、目的の配列を増幅した。増幅したDNAを、常法に従って2%TAEアガロース(Seakem ME Agarose;タカラバイオ社製)ゲルで100V、40分間電気泳動した。ゲルをエチジウムブロマイド溶液(アマシャムバイオサイエンス社製)で染色した後、紫外光照射し配列-8と配列-9で増幅されたDNA断片(279bp)、及び配列-10と配列-11で増幅されたDNA断片(591bp)の両方を有する個体をTg動物として選別した(図1)。

## 【0074】

実施例6:変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン・トランスジェニックマウスの繁殖

実施例4で取得したファウンダーマウスを実施例5に記載した方法で解析することにより導入遺伝子陽性の個体を取得した。当該個体をC57B6/J系統マウス(日本クレアより購入)と交配させ、F1世代を産生した。さらにC57B6/J系統への戻し交配を繰り返してN2~N6世代を産生した。実施例7に記載するサザンハイブリダイゼーション法でF1世代の遺伝子解析を行い、染色体中に組み込まれた遺伝子のコピー数を推定した。当該解析により染色体の複数箇所導入遺伝子が挿入されていることが判明したファウンダーマウスは、C57B6/J系統への戻し交配の過程で、各挿入部位について個別

にラインを確立した。以上の方法により、計9匹のファウンダーマウスを作製し、ここから計12ラインの変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン・トランスジェニックマウスを確立した。

## 【0075】

## 実施例7: サザンハイブリダイゼーション解析

以下の方法により変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子に特異的なジゴキシゲニン標識プローブを調製した。まず変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の一部と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド配列-12及び配列-13をプライマーとして用い、実施例3で調製したpRTHNACP130mを鋳型としてPCRを行った。当該反応にはAmpli Taq Gold (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用い、タカラバイオ社製のTaKaRa PCRサーマルサイクラーMPを使用した。

配列-12: GTGGCTGCTGCTGAGAAAC (配列番号12)

配列-13: GTGGGGCTCCTTCTTCATTC (配列番号13)

## 【0076】

## 反応組成液

pRTHNACP130m (10pg/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCRバッファー (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)	2.5 $\mu$ l
Gene Amp dNTP Mix (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)	1.5 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-12)	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-13)	1 $\mu$ l
滅菌蒸留水	17.75 $\mu$ l
Ampli Taq Gold 5U/ $\mu$ l (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)	0.25 $\mu$ l
総量	25 $\mu$ l

## 【0077】

## 反応条件

94 $^{\circ}$ Cで9分保持後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、更に72 $^{\circ}$ Cで2分間反応させた。これを5回繰り返した後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間の反応を28回繰り返し、目的の配列を増幅した。

## 【0078】

反応終了後の溶液を3  $\mu$ l採取し、常法に従って1.2%アガロースゲル電気泳動で分離し、泳動像を確認した。これにより279bpの変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の一部の配列を有するDNA断片が特異的に増幅されていることを確認した。次にPCR DIGプローブ合成キット (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて、このDNA断片のジゴキシゲニン標識を行った。当該反応にはTaKaRa PCRサーマルサイクラーMPを使用した。

## 【0079】

## 反応組成液

上記PCR反応溶液を滅菌蒸留水で100倍希釈した溶液	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 含PCRバッファー10倍濃度 (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)	5 $\mu$ l
PCR DIG ミックス10倍濃度 (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)	5 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-12)	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴヌクレオチド (配列-13)	1 $\mu$ l
滅菌蒸留水	36.25 $\mu$ l
エキスパンドHigh Fidelity (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)	0.75 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

## 【0080】



**反応条件**

95℃で2分保持後、95℃で1分間、60℃で1分間、更に72℃で2分間反応させた。これを10回繰り返した後、95℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間の反応を35回繰り返した。これにより目的の配列を増幅させるとともに、DIG-dUTPをPCR産物に取り込ませることでジゴキシゲニン標識を行った。

**【0081】**

反応終了後の溶液を3μl採取し、常法に従って1.2%アガロースゲル電気泳動で分画した。ジゴキシゲニンによる標識のため、本来のバンドサイズである279bpよりも、バンドサイズが高分子側にシフトしていることを確認した。

**【0082】**

次に尾組織由来DNAを以下の方法により調製した。尾組織(5mm)を2mlのエッペンドルフチューブに入れ、バッファ-ATL(キアゲン社製)400μlとプロテインネースKソリューション(キアゲン社製)20μlを添加し、55℃で一晩浸漬振盪した。得られた融解液を15000×g、10分、室温(23℃)で遠心し、上清と沈殿に分画した。上清を300μl回収し、核酸自動分離装置PT-200(クラボウ社製)を用いてDNAを精製した後、分光光度計DU-640(ベックマン社製)を用いてDNA濃度を定量した。尾組織由来DNA、10μgをEcoRIで処理し、常法に従って1.2%アガロースゲル電気泳動で分画してナイロンメンブレンプラスチャージ(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)に転写した。メンブレンをハイブリ・バック(コスモ・バイオ社製)に入れてDIG Easy Hyb(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)20mlを添加し、42℃で30分間浸漬振盪した。変異型ヒトα-シヌクレイン遺伝子特異的プローブ(100℃で10分加熱した後、直ちに氷上で急冷したもの)を20mlのDIG Easy Hybに希釈し(終濃度50ng/ml)、ハイブリ・バック内のDIG Easy Hybと交換した。これを42℃で12時間浸漬振盪した後、メンブレンを2×SSC(0.1% SDS)で42℃、10分間処理し、0.1×SSC(0.1% SDS)で65℃、40分間処理した。メンブレンと特異的に結合したジゴキシゲニン標識プローブの検出は、DIG洗浄およびブロックバッファセット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて行った。すなわち、メンブレンをマレイン酸バッファ(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)で2倍に希釈したブロッキング溶液(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)に浸し、室温(23℃)で2時間振盪した。次にアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニンFabフラグメント(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)をこの溶液で10000倍希釈し、メンブレンを30分間浸漬振盪した。さらにメンブレンを洗浄バッファ(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)で40分間洗浄した後、CDP-Star(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を検出バッファ(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)で100倍希釈して、メンブレンを反応させた。シグナルの検出はルミ・イメージャーF1ワークステーション(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を使用した。

**【0083】**

サザンハイブリダイゼーション解析の結果、トランスジェニックマウスでは導入遺伝子に由来する346bpのバンドが検出されたが、野生型マウスでは検出されなかった(図2A)。当該バンドのシグナル強度は各ラインで大きく異なっていた。シグナル強度から各ラインの挿入コピー数を推察したところ、最も高いコピー数を持つライン(1702ライン)は、約30コピーの導入遺伝子が挿入されているものと考えられた。

**【0084】**

なお、作製したトランスジェニックマウス(1702ライン)の受精卵(識別のための表示: TH/syn130m1702)は、受託番号FERM P-19546として、平成15年10月2日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6)に寄託されている。この細胞に由来するマウスは、ドーパミン産生神経においてヒトα-シヌクレイン遺伝子の変異体を発現する。

## 【0085】

## 実施例8:ノーザンハイブリダイゼーション解析

マウス脳組織を採材し、クライオチューブ(直径12mm、長さ40mm、ナルジェス社製)に入れて速やかに液体窒素で凍結した。凍結した脳組織はRNAを抽出するまでディープフリーザー(サンヨー社製)に入れて-80℃で保存した。(株)日本ジーンが推奨する方法により、ISOGEN(日本ジーン社製)を用いてTotal RNAの抽出を行った。すなわち、凍結した脳組織を液体窒素に浸しながらハンマーで叩き破碎した。破砕片を100mg量り、2mlのエッペンドルフチューブに入れた。ISOGEN 1mlを添加し、ホモジェナイザー(日立製作所社製)を用いて20秒間破壊した。チューブを室温(23℃)で5分間静置した後、クロロホルム200 $\mu$ lを加えて2分間激しく攪拌した。チューブを3分間静置した後、12000 $\times$ g、15分、4℃で遠心し、上清600 $\mu$ lを回収した。これにイソプロパノール500 $\mu$ lを加えて10分間静置した。12000 $\times$ g、10分、4℃で遠心し、沈殿を70%エタノールで洗浄した。洗浄した沈殿をジエチルピロカーボネート処理水300 $\mu$ lに融解し、分光光度計DU-640(ベックマン社製)を用いてRNA濃度を定量した。

## 【0086】

ロシュ・ダイアグノスティックスが推奨する方法により、オリゴテックスdT30スーパー(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いてtotal RNAよりポリ(A)<sup>+</sup>RNAの抽出を行った。すなわち200 $\mu$ gのtotal RNAにElution Buffer(10mM Tris-HCl pH7.5、1mM EDTA、0.1% SDS)を加え全量で200 $\mu$ lとした。オリゴテックスdT30スーパーを200 $\mu$ lに加え、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。5M NaClを40 $\mu$ lに加え、37℃で10分間インキュベートした。15000 $\times$ g、3分、4℃で遠心し、上清を除去した。沈殿をWashing Buffer(10mM Tris-HCl pH7.5、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.1% SDS)500 $\mu$ lに懸濁した。15000 $\times$ g、3分、4℃で遠心し、上清を除去した。沈殿をジエチルピロカーボネート処理水200 $\mu$ lに懸濁した後、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。15000 $\times$ g、3分、4℃で遠心し、上清中のポリ(A)<sup>+</sup>RNAを回収した。

## 【0087】

5 $\mu$ gのポリ(A)<sup>+</sup>RNAを常法に従って1.0%変性アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロンメンブレンプラスチャージ(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)に転写した。実施例7と同じ方法で導入遺伝子mRNAの検出を行った。検出後、メンブレンを0.5% SDSで100℃、10分加熱することによりプローブを除去した。次に各レーンにアプライしたポリ(A)<sup>+</sup>RNA量を補正する目的で同じメンブレンを用いてジギキゲン標識した $\beta$ -actinのcDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの条件は上述した方法と同一である。またジギキゲン標識 $\beta$ -actin cDNA断片は、マウス脳由来cDNAを鋳型とし、配列-14及び配列-15をプライマーとして上述したのと同様の方法を用いて作製した。

## 【0088】

配列-14: TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG (配列番号14)

配列-15: TTTGATGTCACGCACCATTTCC (配列番号15)

## 【0089】

ノーザンハイブリダイゼーションの結果、変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子特異的プローブにより外来性のヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子だけでなく内在性のマウス $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の発現も検出された。前者のmRNAは約1.0kbのバンドとして検出され、後者のmRNAは約1.6kbのバンドとして検出された。ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の発現量は各ライン間で大きく異なっており、サザンハイブリダイゼーションで推察された導入遺伝子の挿入コピー数と強く相関していた。すなわち、最も挿入コピー数が高い(約30コピー)と推察された1702ラインでは発現量が最も高かった(図2B)。

## 【0090】

## 実施例9: ウェスタンブロッティング解析

マウス脳組織にそれぞれ20倍量のTBSバッファー(20mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaClにprotease inhibitor Complete Mini (ロシュ・ダイアグノスティックス社製), 1% phosphatase inhibitor cocktail I (シグマ社製)を溶解したもの)を添加し、ホモジェナイザー(日立製作所社製)で破壊した。さらに超音波破壊(タイテック社製)を行い、得られた融解液を2500回転3分4℃で遠心した。上清を回収しさらに45000回転1時間4℃で遠心した。その上清についてbicucullinic acid (BCA) protein assay (ピアス社製)を用いて蛋白濃度を測定した。

## 【0091】

これらの蛋白をSDS-polyacrylamide gel (テフコ社製)で電気泳動して分画し、PVDF membrane (アマシャム社製)にセミドライ式で2mA/cm<sup>2</sup>、120分の条件で転写した。変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の検出には16%のゲルを用い、チロシンヒドロキシラーゼ蛋白の検出には10%のゲルを用いた。転写後のPVDF membraneは、5%スキムミルクを含むTBS溶液で一晩、4℃でブロッッキングした。ヒト型およびマウス型 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白を検出するために、一次抗体として $\alpha$ -シヌクレイン蛋白特異的抗体であるNACP-5 (Wakabayashi, K. et al. Acta Neuropathol (Berl) 99, 14-20 (2000))を使用した。NACP-5は0.5%スキムミルクを含むTBSで5000倍希釈して使用した。チロシンヒドロキシラーゼ蛋白の検出には、抗チロシンヒドロキシラーゼポリクローナル抗体(Novus Biologicals社製)を同様に400倍希釈して使用した。二次抗体はHRP標識抗ウサギIgG (アマシャム社製)を同様に1000倍希釈して使用した。検出は、ECL western blotting detection reagents (アマシャム社製)を基質に用いてHyper film ECL (アマシャム社製)に感光し、ImageMaster 1D Eluteにてバンドの測定を行った。

## 【0092】

C末側10残基を欠損するヒト変異型 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白は、内在性マウス型 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白(電気泳動上の分子量約19kDa)より低分子量側に約18kDaのバンドとして検出された。このため同一メンブレンを用いて外来性と内在性 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の発現量を比較定量することが可能であった。最も遺伝子発現量が高い1702ラインでは、内在性 $\alpha$ -シヌクレイン蛋白と比較して、線条体部位で約3倍、中脳部位で約2倍のヒト $\alpha$ -シヌクレイン蛋白が発現していることが確認された(図2C)。

## 【0093】

チロシンヒドロキシラーゼ蛋白は分子量約56kDaのバンドとして検出された。 $\alpha$ -シヌクレインの発現量が最も高い1702ラインでは、生後8週齢及び1年齢の線条体において、チロシンヒドロキシラーゼ蛋白量が野生型マウスのそれぞれ40%、60%まで有意に低下していた(図3)。

## 【0094】

## 実施例10: 正向反射テスト

生後3日から14日齢の仔マウスを対象として、濾紙上に被験体を仰向けに置き、正常位に戻るまでの時間を計測した。時間はストップウォッチ(Time Keeper、セイコー社製)により0.1秒の単位まで測定した。観察限度時間は30秒とし、観察限度時間内に反射が観察されない場合は、反射潜時30秒とした。午後1時から午後2時の時間帯に毎日3試行実施し、その中央値を粗点とした。統計解析はMann-Whitney's U検定を用いて行った。

## 【0095】

1702ラインにおいて、生後12日齢以前の成績に有意な反射潜時の延長が認められた。野生型マウスは、10日齢以降ほとんどの個体が1秒以内に正向反射を成立させが、

1702ラインのTgマウスでは、10日齢以降でも10秒以上仰向けの状態から起き上がれない個体が観察された(図4)。

#### 【0096】

##### 実施例11: 自発運動量の測定

生後8週齢及び1年齢の雄マウスを対象として、1日間の運動量を赤外線感知型運動量測定装置(AB-System、ニューロサイエンス社製)を用いて測定した。明暗周期は明期12時間(午前7時から午後7時)、暗期12時間(午後7時から午前7時)とした。測定前日の午後7時より被験体を、床敷を敷いた小型ポリカーボネート製透明ケージ(L×W×H=23×17×12cm)に入れて、十分に馴化を行った。測定日は同一ケージを用いて、午前11時から翌日の午前11時までの運動量を1時間ごとに24時間測定した。運動量は24時間の累積カウントとして表現した。統計解析はStudent's t-testで有意差検定を行なった。

#### 【0097】

1702ラインにおいて、1日間の総自発運動量が有意に低下していた。これは主として活動期(暗期)の運動量が低下しているためであった(図5)。

#### 【0098】

##### 実施例12: 脳内モノアミン量測定

1702ラインの生後8週齢および1年齢マウスの脳より中脳黒質部および線条体を、また5日齢および10日齢のマウスからは全脳を摘出し、それぞれ液体窒素で凍結した。凍結した組織を粉砕機で粉砕した後、重量を測定して組織100mgに対して0.5mlの0.2M過塩素酸(100μMのエチレンジアミン四酢酸2ナトリウムと10μMのパーリリンを含む)を加え、ミニコードレスグラインダー(ベルテックエンタープライズ社製)を用いてホモジナイズした。ホモジナイズ試料を氷中で30分間静置した後、0℃、2万×gで20分間遠心し、上清を回収した。採取した上清を1Mの酢酸ナトリウムにてpH3付近に調整後、孔径0.22μmのマイクロコンフィルター(ミリポア社製)で濾過しモノアミン測定用サンプルとした。

#### 【0099】

モノアミン量は以下の条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定した。まずモノアミン、7種(ドーパミン; DA、ホモバニリン酸; HVA、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸; DOPAC、L-3-メトキシチラミン; 3-MT、ノルエピネフリン; NE、セロトニン; 5-HT、5-ヒドロキシインドール酢酸; 5-HIAA)の高濃度標品(各1mg/mL)を調製し、これらの溶液をすべて混合して0.1M酢酸(1mg/mLのエチレンジアミン四酢酸2ナトリウム含有)で希釈し、最終濃度10ng/μLの7種混合の標準標品を作製した。当該標品は分解を避けるため使用時まで4℃で遮光保存した。

#### 【0100】

高濃度標品(1mg/mL)

標品調製には液体クロマトグラフィー用蒸留水(ナカライテスク社製)を使用

標品は全てシグマ社より購入

DA	6.19mg/5mL	0.1N塩酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)
HVA	5mg/5mL	0.1N塩酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)
DOPAC	5mg/5mL	0.1N塩酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)
3-MT	6.09mg/5mL	0.1N塩酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)
NE	5mg/5mL	0.1N塩酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)
5-HT	6.04mg/5mL	0.1M 酢酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)
5-HIAA	5mg/5mL	0.1M 酢酸(1mg/mL	EDTA・2Na含有)

#### 【0101】

次に標準標品をHPLCにて、以下に示す条件で分析した。

HPLC分析条件

カラム: EICOMPAC SC-5 ODS  $\phi 3.0\text{ mm} \times 150\text{ mm}$  (エイコム社製)

プレカラム: ガードカートリッジ (資生堂社製)

流速:  $0.5\text{ mL/分}$

作用電極: グラッシーカーボン

加圧電圧:  $+700\text{ mV}$

設定温度:  $30^\circ\text{C}$

測定時間: 25分間

測定装置: NANOSPACE SI-1シリーズ (資生堂社製)

電気化学検出器 (SI-1/2005)

ポンプ (SI-1/2001)

脱気装置 (SI-1/2009)

データ解析装置 (S-MicroChrom Version 4.1)

#### 【0102】

移動相組成

0.1 M酢酸・クエン酸溶液 (pH 3.9)	82%
(0.1 M酢酸ナトリウム溶液: 0.1 Mクエン酸溶液 = 10:7 混合液で pH 3.9)	
メタノール (液体クロマトグラフィー用)	18%
1-オクタンスルホン酸ナトリウム	$190\text{ mg/L}$
エチレンジアミン四酢酸2ナトリウム	$5\text{ mg/L}$

#### 【0103】

まず測定用移動相を調製し、電気化学検出器の測定値が安定するまでカラムを移動相で平衡化した。測定値の安定を確認した後、調製した7種混合標品を0.02 M酢酸 ( $200\text{ mM}$ エチレンジアミン四酢酸2ナトリウム含有) で更に200倍希釈し、 $500\text{ pg/L}$  ( $10\text{ }\mu\text{L}$ 液 (用時調製)) を調製してHPLCに $10\text{ }\mu\text{L}$ 注入した。標品はノルエピネフリン、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸、ドーパミン、5-ヒドロキシインドール酢酸、ホモバニリン酸、L-3-メトキシチラミン、セロトニンの順にピークが検出されることが知られており、各ピーク面積およびリテンションタイムにずれが生じないことを確認した。次に脳ホモジネートより抽出した試料の測定を行った。1検体に付き $10\text{ }\mu\text{L}$ 、25分毎にオートサンプラーを用いて自動注入し測定した。測定までの間、試料は恒温槽で $4^\circ\text{C}$ に保冷した。モノアミン量は、各標品 $500\text{ pg/L}$ のピーク面積に対する試料のピーク面積の比例計算によって算出し、組織 $1\text{ mg}$  (試料 $5\text{ }\mu\text{L}$ 分) に換算した。

#### 【0104】

算出法:

組織 $1\text{ mg}$ のモノアミン (pg) = 試料ピーク面積  $\div$  標品ピーク面積  $\times 500$  (pg)  $\div 2$

#### 【0105】

その結果、1702ラインのトランスジェニックマウスでは野生型に比べて、生後8週齢および1年齢ともに中脳黒質部のドーパミン量が減少していた (図6)。特に、8週齢マウスで有意に減少しており野生型の約60%だった。同様にドーパミンの分解産物のホモバニリン酸も8週齢のトランスジェニックマウスで有意に低下していた。しかし、セロトニン量は変化していなかった。次に線条体のドーパミン量は、8週齢、1年齢とも有意に減少しており、特に8週齢では野生型の約50%まで低下していた (図7)。さらに若齢期マウスでも、成体同様ドーパミン量の有意な減少が確認された (図8、9)。特に10日齢マウス (図9) のドーパミン量は野生型の約60%で、既に生後10日でドーパミン含量が顕著に減少している事が確認された。

#### 【0106】

実施例13: 免疫組織染色

分離した1702ラインのトランスジェニックマウスの脳をマイルドホルム20MN（和光社製）で室温で1日固定した後、メスを用いてブレグマから前脳側2mmとブレグマ0mmで冠状面に切り出し、これを線条体部とした。またブレグマから後方2.5mmとラムダ0mmで冠状面に切り出し、これを中脳とした。この後、常法に従いパラフィン包埋し、厚さ3ミクロンで薄切して切片を調製した。抗原賦活化のために切片を脱パラフィンした後10mMクエン酸緩衝溶液（pH6.0）中でマイクロウェーブ処理を施し、0.5%ブロッキングリジェント/マレイン酸緩衝溶液（100mMマレイン酸、150mM塩化ナトリウム、pH7.5）を用いてブロッキング処理した（37℃、20分）。免疫組織染色には1/100希釈したウサギ抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体（フナコシ社製、VN-3109-00）または1/2000希釈したマウス抗ヒト型 $\alpha$ -シヌクレインモノクローナル抗体、LB509（コスモバイオ社製、ZYM180215）を一次抗体として用い、終濃度10 $\mu$ g/mlになるように希釈した。ビオチン化抗ウサギIgG（フナコシ社製、41-0510-00）またはビオチン化抗マウスIgG（フナコシ社製、41-0520-00）を二次抗体として用いた。免疫組織染色は自動免疫染色システム（ペンタナ・ジャパン社製）を用い、ペンタナ社推奨の方法に従った。またマイヤーのヘマトキシリン（和光社製、131-09665）を用いて細胞核を同時に染色した。

#### 【0107】

その結果、1702ラインのトランスジェニックマウスの中脳にLB509陽性細胞すなわちヒト型 $\alpha$ -シヌクレインを発現する神経細胞を多数見出すことができた。また、これらLB509陽性神経細胞は同時にチロシンヒドロキシラーゼに陽性であり、導入した遺伝子が所望の部位の所望の神経細胞で発現していることを確認できた（図10）。

#### 【0108】

実施例14：チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞数の定量

以下の要領で1702ラインのトランスジェニックマウスの中脳の半連続的切片を調製した。まず厚さ3ミクロンで切片を1枚とった後、9枚分の切片を取り除いた。この作業を繰り返すことにより、理論的に厚さ30ミクロンの脳組織につき3ミクロンの切片を1枚得ることができる。このようにして得られた中脳領域のすべての切片について、実施例13に記載したのと同様の方法で抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体を用いて免疫組織染色を行った。これらの切片を光学顕微鏡で観察することによりブレグマ後方2.8mmから3.8mmの範囲の切片を選び出した。当該切片の左側腹側被蓋野領域と黒質緻密部領域が視野に収まるように観察し、Photograb-2500（富士フイルム社製）を用いて画像データをコンピューターに取り込んだ。次に画像データを印刷し細胞核を確認できる神経細胞のみを数えることにより、チロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞数を計測した。また画像データをIPLabソフト（Scanalytics社製）を用いて解析することによりチロシンヒドロキシラーゼ陽性領域の定量を行った。この目的のために画像中のチロシンヒドロキシラーゼ陽性領域が選択されるようにColar segmentation componentsをRsIn98-maxに設定し、Total areaと黒質緻密部領域を測定した。その結果、1702ラインのトランスジェニックマウスの黒質緻密部領域において、チロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞が同週齢、同性の野生型マウスと比べて統計学的に有意に減少していることが確認できた（図11A、B）。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0109】

【図1】図1は、PCR法による変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスの選別を示す。279bpのバンドと591bpのバンドが両方とも検出できる個体が、所望のトランスジェニックマウスである

【図2】図2は、遺伝子発現解析の結果を示す。A：染色体に組込まれた遺伝子のコピー数のサザンハイブリダイゼーションによる解析、B：脳における遺伝子発現のノーザンハイブリダイゼーションによる解析、C：変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン蛋白の

ウエスタンブロッティングによる解析

【図3】図3は、線状体におけるチロシンヒドロキシラーゼ蛋白量のウエスタンブロッティングによる定量の結果を示す。

【図4】図4は、正向反射の結果を示す、

【図5】図5は、自発運動量の測定結果を示す。

【図6】図6は、生後8週齢及び1年齢の個体の中脳のモノアミン量の定量の結果を示す。DA：ドーパミン、HVA：ホモバニリン酸、5-HT：セロトニン

【図7】図7は、生後8週齢及び1年齢の個体の線状体のモノアミン量の定量の結果を示す。DA：ドーパミン、HVA：ホモバニリン酸、5-HT：セロトニン

【図8】図8は、生後5日齢の個体の全脳のモノアミン量の定量の結果を示す。DA：ドーパミン、HVA：ホモバニリン酸、5-HT：セロトニン

【図9】図9は、生後10日齢の個体の全脳のモノアミン量の定量の結果を示す。DA：ドーパミン、HVA：ホモバニリン酸、5-HT：セロトニン

【図10】図10は、生後8週齢の個体の脳のLB509を用いた免疫組織染色を示す。

【図11】図11は、生後8週齢の個体の中脳領域のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞の定量の結果を示す。A：細胞数の実測値、B：チロシンヒドロキシラーゼ陽性領域の画像解析による定量、薄い部分が黒質緻密部、濃い部分が腹側被蓋野

## 【配列表】

【0110】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; Transgenic non-human mammal

&lt;130&gt; A31646A

&lt;160&gt; 16

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

ggaattcatt agccatggat gtattc 26

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

agccacttaa ggaaccagtg catacc 26

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 3

agctctaata cgactcacta taggg 26

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

cagccactgt tgccacacca tgc 23

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

agggttttcc cagtcacgac gttg 24

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA



<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA  
<400> 6  
gcatggtgtg gcaacagtgg ctg 23  
<210> 7  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA  
<400> 7  
tagccttaag ttactcagaa ggcattt 27  
<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA  
<400> 8  
gtggctgctg ctgagaaaac 20  
<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA  
<400> 9  
gtggggctcc ttcttcattc 20  
<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA  
<400> 10  
aggactgggt ggcttccaac tcccagacac 30  
<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA  
<400> 11  
agcttctcat tgctgcgcgc caggttcagg 30  
<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

gtggctgctg ctgagaaaac 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gtggggctcc ttcttcattc 20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

tgtgatgggtg ggaatgggtc ag 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

tttgatgtca cgcaccattt cc 22

<210> 16

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 16

Met	Asp	Val	Phe	Met	Lys	Gly	Leu	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Val
1				5					10					15	

Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Gln	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Lys
			20					25					30		

Thr	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Glu	Gly	Val
		35					40					45			

Val	His	Gly	Val	Ala	Thr	Val	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Glu	Gln	Val	Thr
	50					55					60				

Asn	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Lys
65					70				75					80	

Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Phe	Val	Lys
				85				90					95		

Lys	Asp	Gln	Leu	Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile
			100				105					110			

Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Glu	Ala	Tyr	Glu	Met	Pro
		115				120						125			

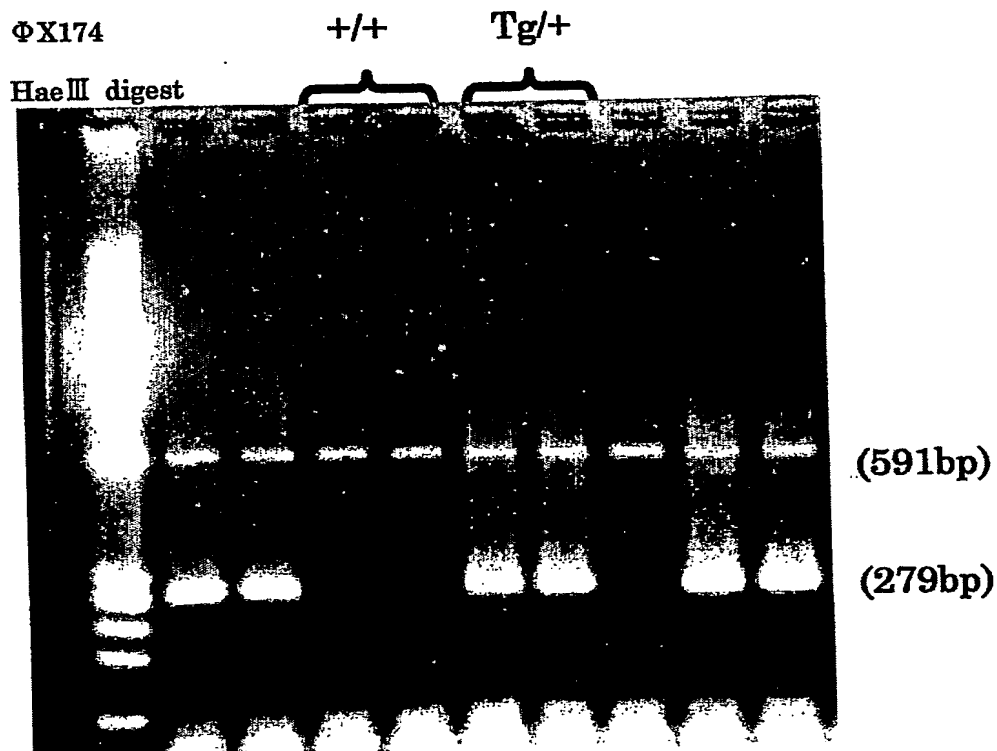
Ser	Glu	Glu	Gly	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Glu	Pro	Glu	Ala				
						135						140			



【書類名】 図面

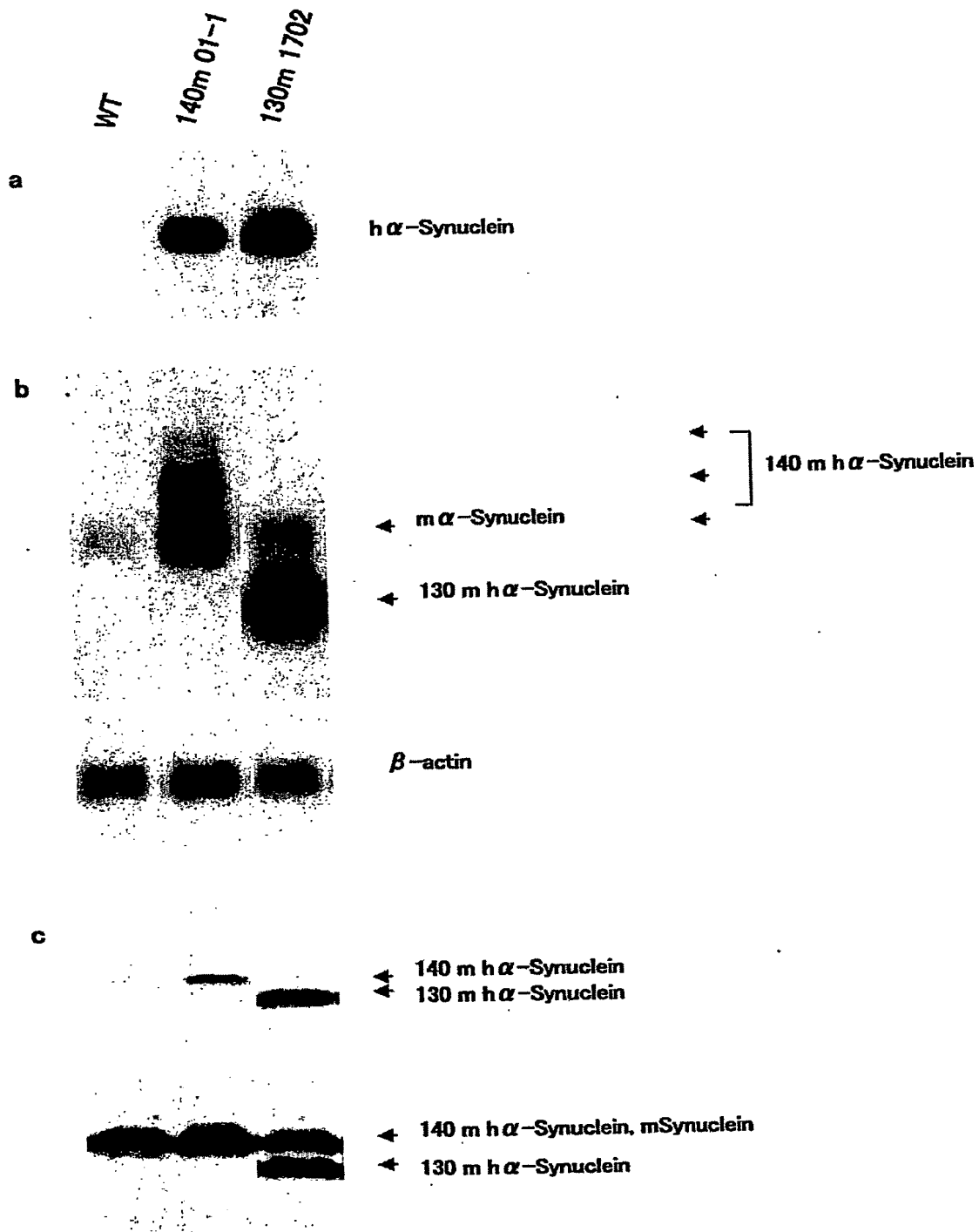
【図 1】

図 1



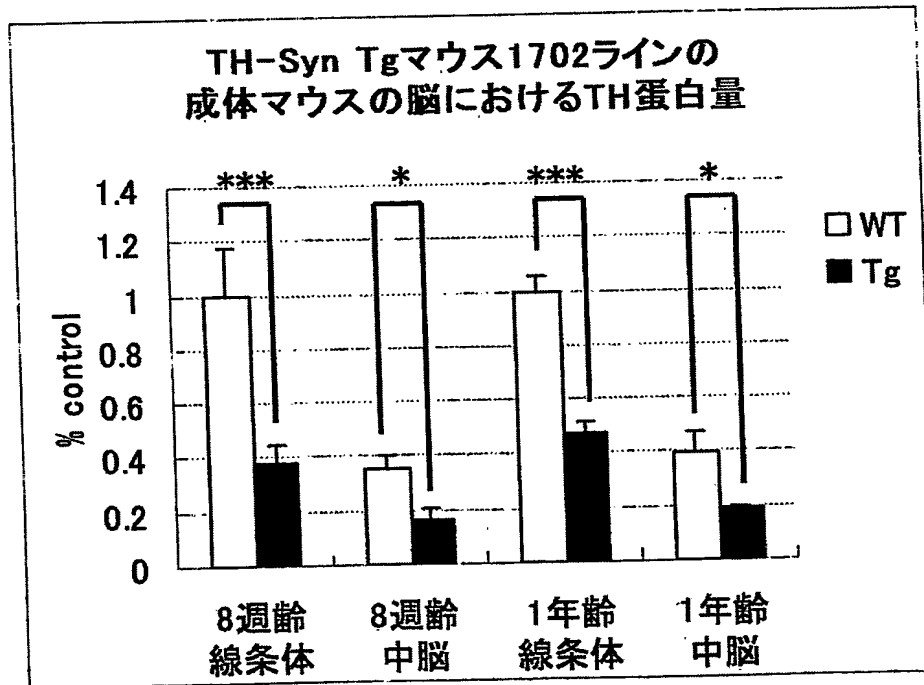
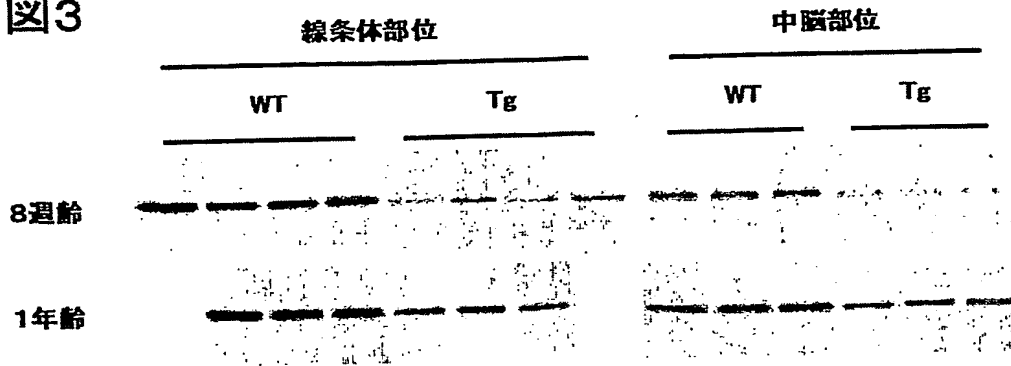
【図 2】

図 2



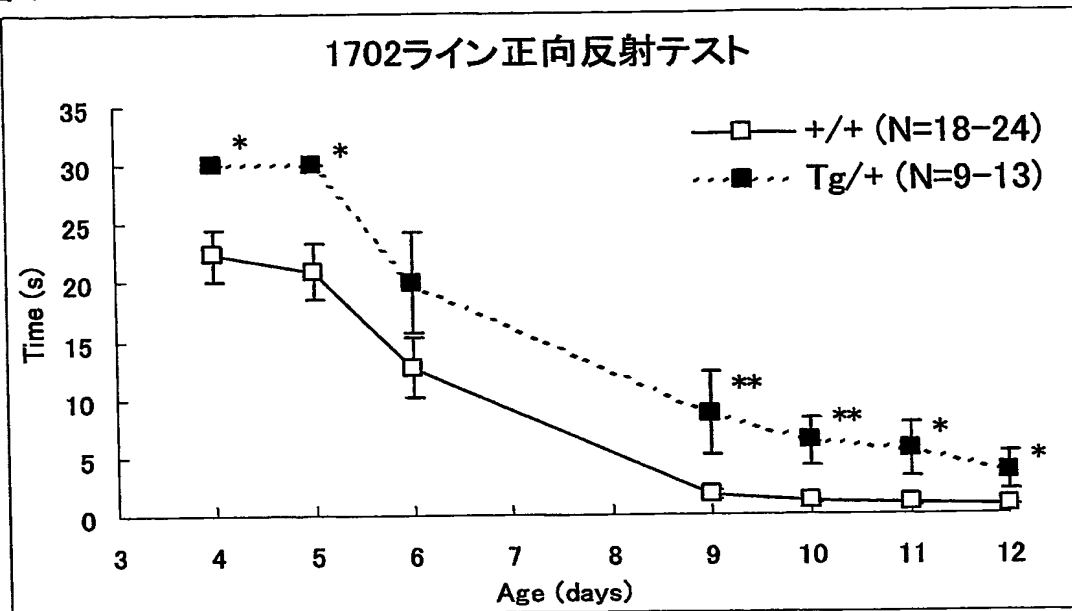
【図3】

図3



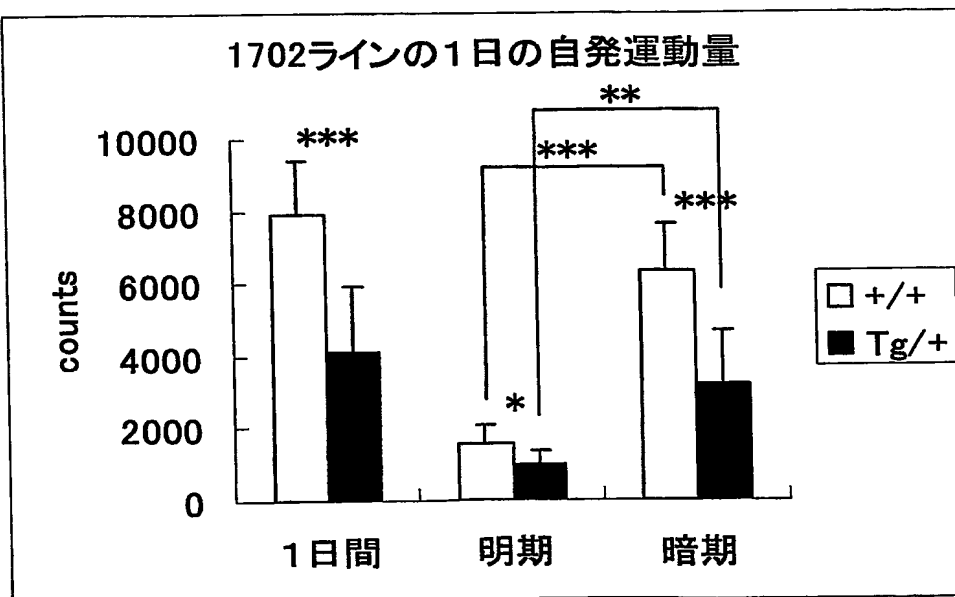
【図 4】

図4



【図 5】

図5



【図6】

図6A

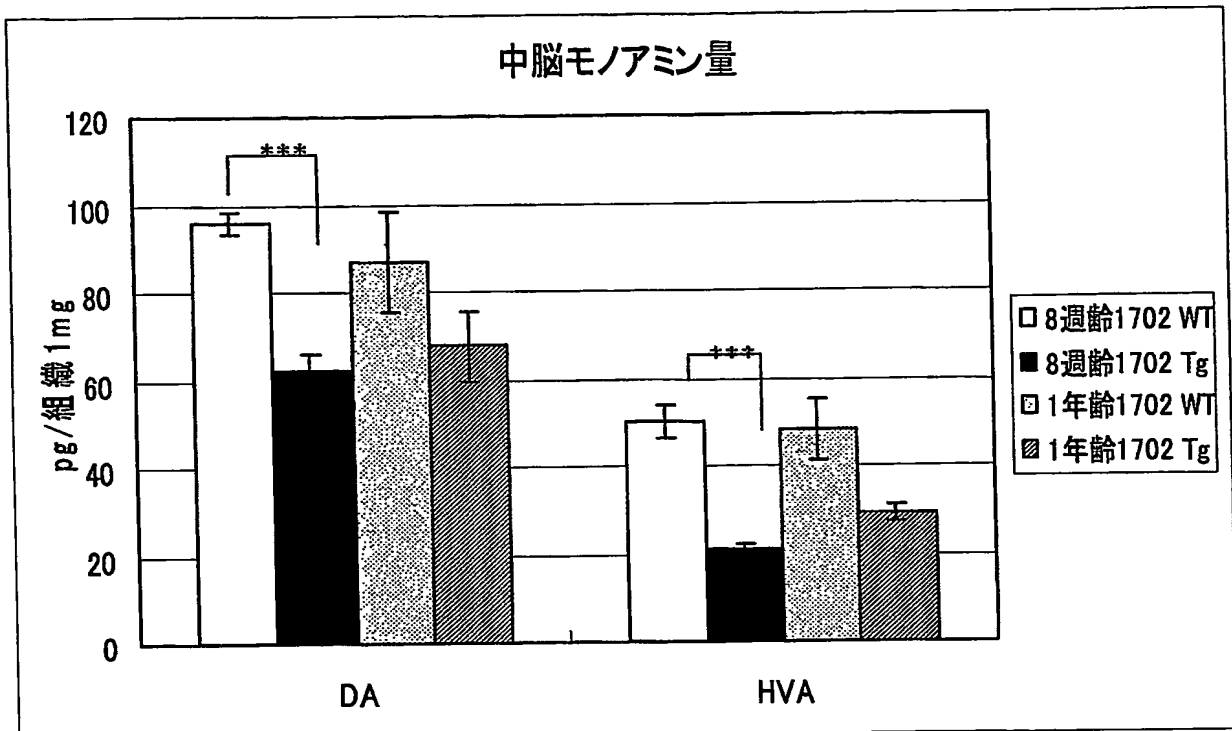
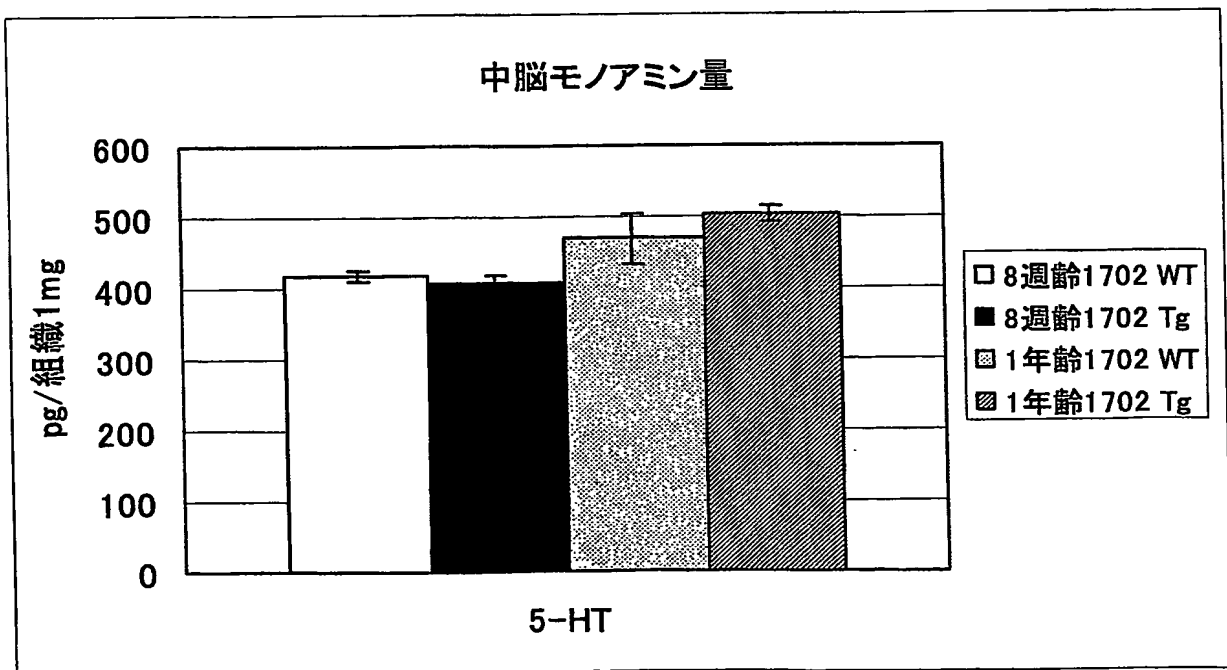


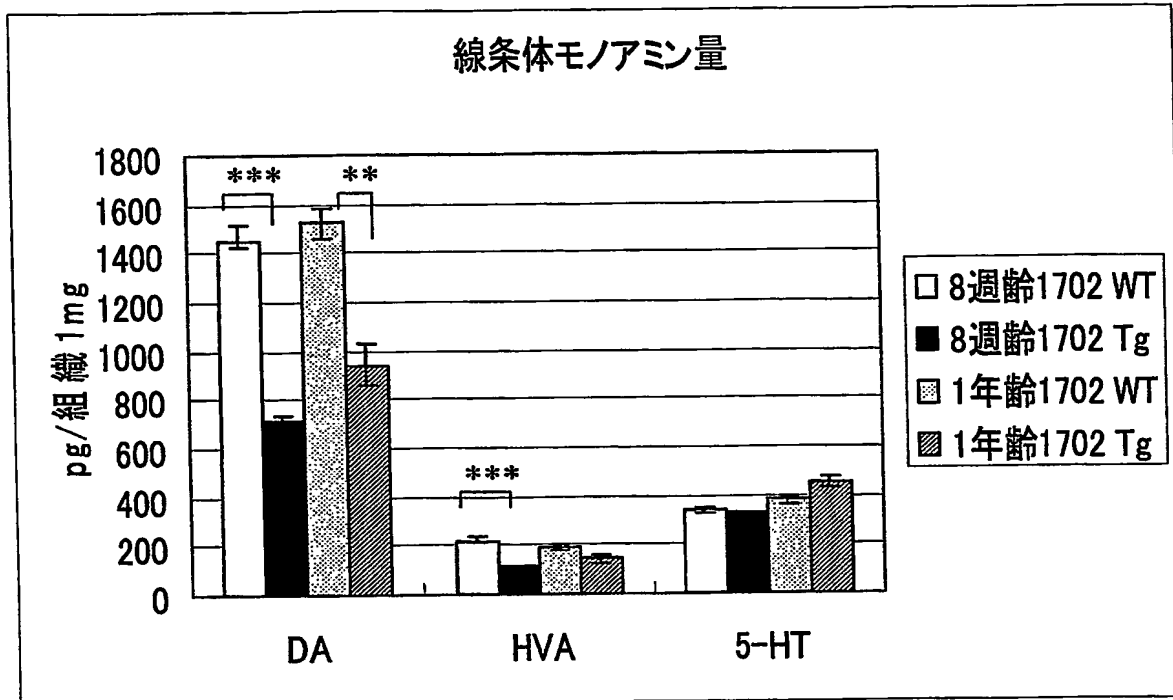
図6B





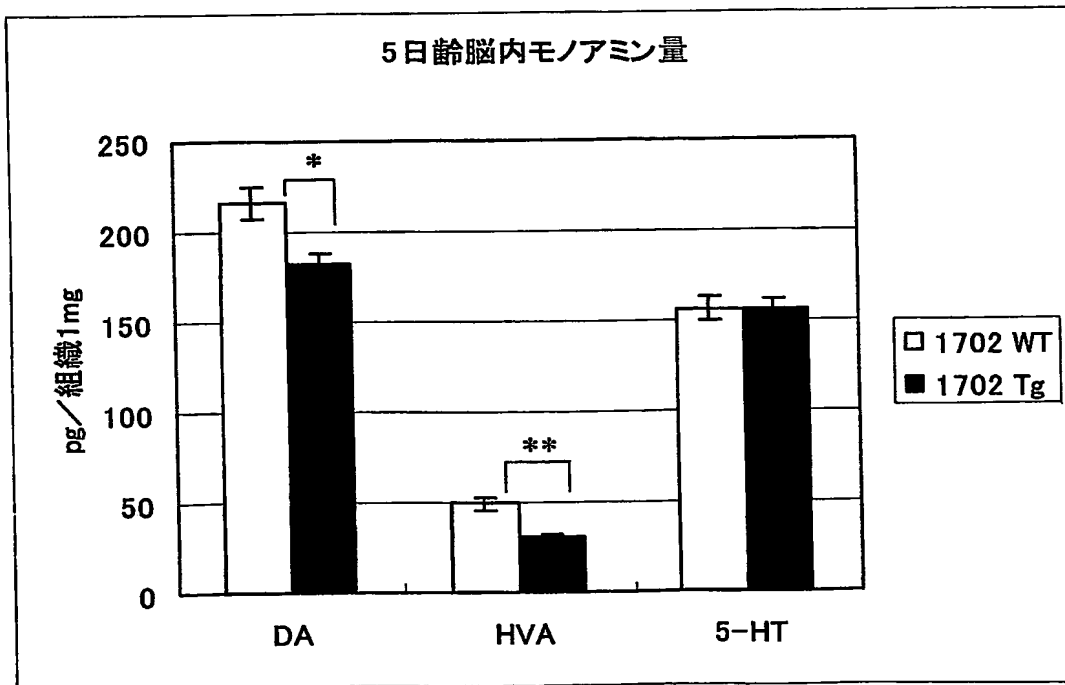
【図 7】

図7



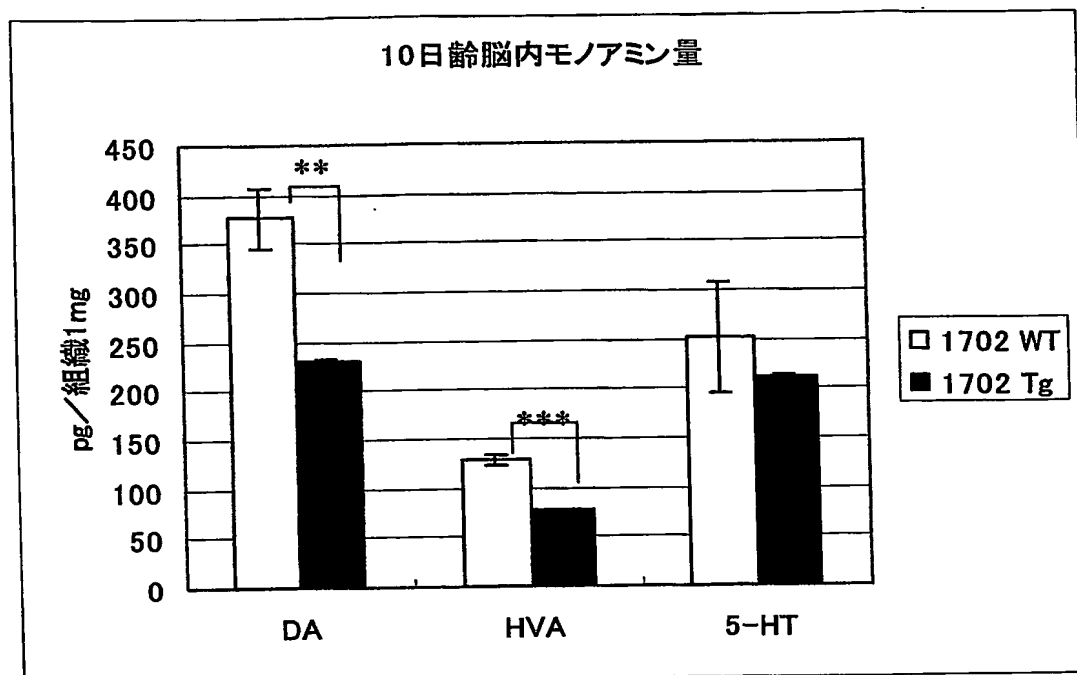
【図 8】

図8



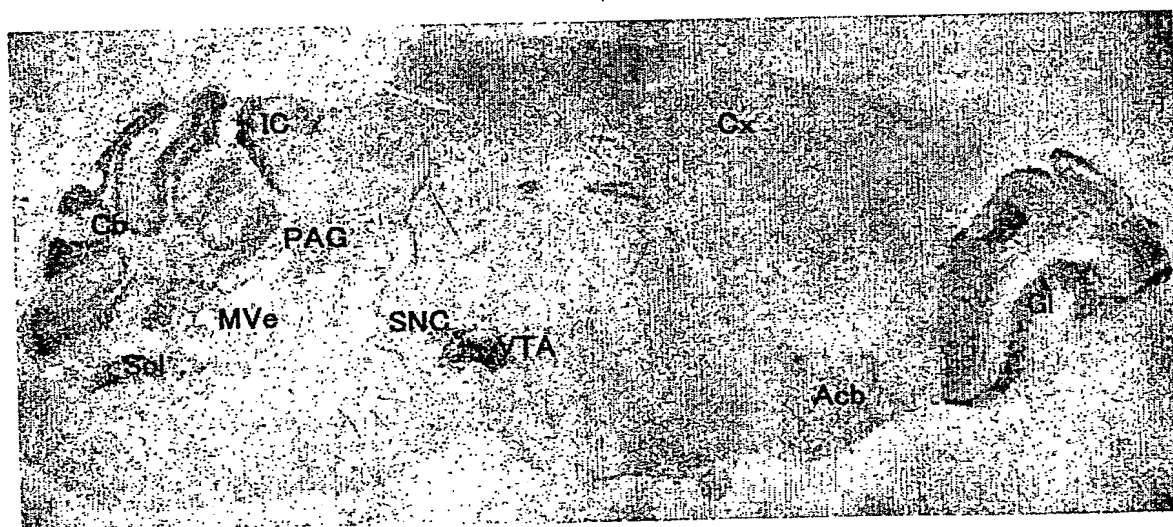
【図9】

図9



【図10】

図10



【図 11】

図 11A

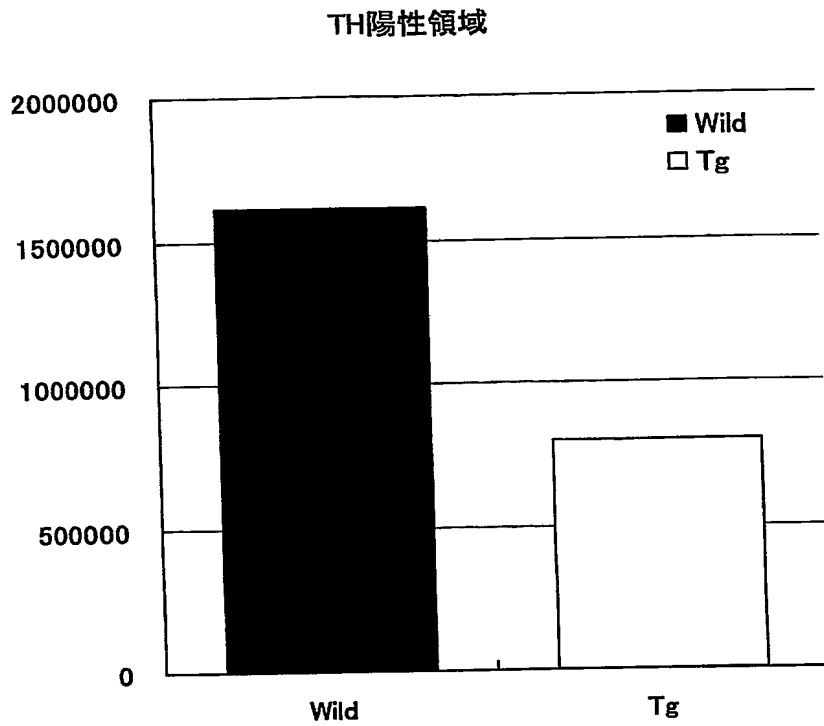
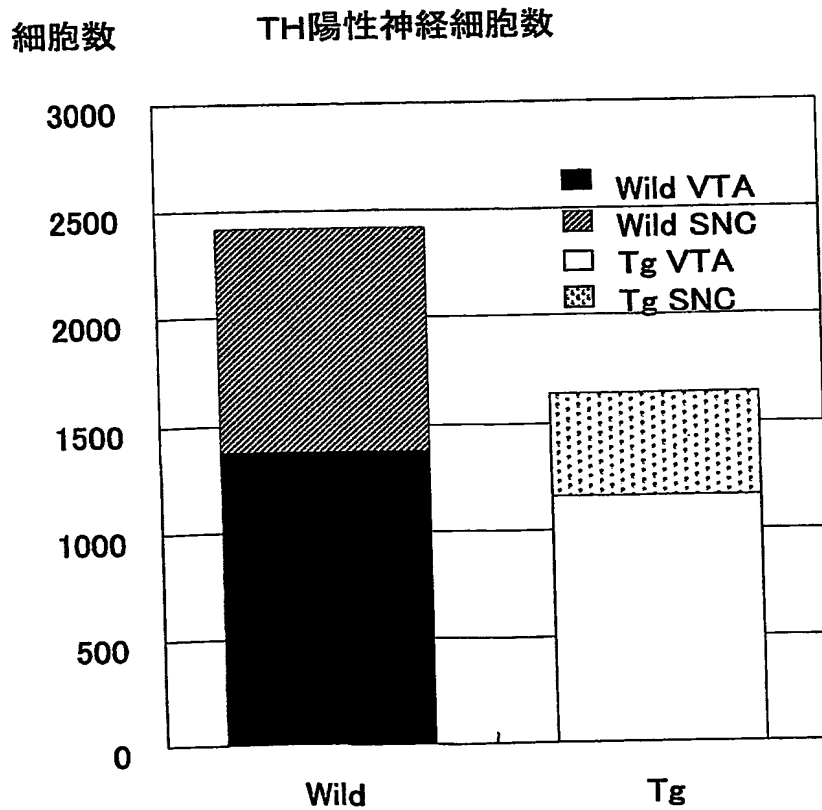


図 11B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されたパーキンソン病モデル動物を提供すること。

【解決手段】  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されており、脳の神経細胞で該遺伝子を発現し、かつ脳の黒質におけるドーパミン産生神経細胞数が野生型動物と比較して有意に減少していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 7 0 5 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 2 8 1 9 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 2 2 日  
新規登録  
東京都豊島区高田 3 丁目 2 4 番 1 号  
大正製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**